

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

G01N 33/48

G01N 33/52



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97129788.6

[43]公开日 1998 年 12 月 23 日

[11] 公开号 CN 1202620A

[22]申请日 97.12.31

[30]优先权

[32]96.12.31[33]US[31]779,735

[71]申请人 生命扫描有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 J·道格拉斯 E·基瑟尔

M·F·托马斯科 R·达托

E·G·赖克 D·P·托海

M·马克森 Z·维特科

S·瑟格克

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳

权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图页数 10 页

[54]发明名称 可用肉眼读取结果的试剂检测条

[57]摘要

一种多层试剂检测条测量涂在其上的生物体液中
被分析物的浓度。样本被引到沿检测条排列的大
量化验区，在那里被分析物与试剂反应发生变色。
每个化验区还含有变色反应的抑制剂。抑制剂浓度
在连续的化验区中升高，因此由变色的化验区数量
给出被分析物浓度的测量结果。该检测条特别适用
于测量全血样本中的葡萄糖。在优选的实施方式中
沿通过选择性挤压膜上区域所形成的路径将样本引
到化验区，化验区即是膜上未被挤压的区域。

权 利 要 求 书

1. 一种用于测量涂在其上的生物体液样本被分析物浓度的加长多层试剂检测条, 包括

5 a) 一个底层, 该底层有一个接受样本的贯通的孔;

b) 一个膜层, 面对底层一面为样本面, 相对的另一面为检测面, 该膜层沿其长度方向分布有大量吸水性化验区, 彼此之间是被非吸水区分隔开的, 膜中含有一种能与分布析物反应发生变色的试剂, 该试剂组成包括

i) 与被分析物反应生成过氧化氢的第一种成分;

10 ii) 与过氧化氢反应发生变色的第二种成分; 和

iii) 抑制第二种成分变色的第三种成分;

c) 一个位于底层与膜层之间的中间层;

d) 使样本沿检测条分布开来的计量装置, 该装置组成包括形成中间层内的流体转运通道, 引导样本经膜表面到达吸水性化验区;

15 抑制剂浓度在离检测条第一端一定距离处以预定方式升高, 因此如果要发生变色, 样本中所含有的被分析物浓度也必须相应升高, 其中在检测条上样后, 一个或几个化验区发生变色, 而离第一端最远的变色区指示出样本中被分析物的浓度。

2. 权利要求 1 的检测条, 其中的被分析物为葡萄糖。

20 3. 权利要求 1 的检测条, 其中的生物体液为血液。

4. 权利要求 1 的检测条, 其中的底层组成包括一个热塑片。

5. 权利要求 4 的检测条, 其中的底层组成包括聚酯。

6. 权利要求 1 的检测条, 其中的底层进一步含有大量正对着化验区的贯通的孔。

25 7. 权利要求 1 的检测条, 其中的底层有一个透明的部分, 以确保有充足的样本量, 该透明部分位于离样本接受孔一定距离处。

8. 权利要求 1 的检测条, 其中的膜层组成包括一个各向异性的多孔膜, 膜上的孔靠近样本面的较大, 靠近检测面的较小。

9. 权利要求 8 的检测条, 其中的生物体液为含有红细胞的全血。

30 10. 权利要求 9 的检测条, 其中的孔径的选择要使全血样本中红细胞被捕

获在膜中。

11. 权利要求 8 的检测条, 其中的膜组成包括聚砜。
12. 权利要求 1 的检测条, 其中的流体转运通道基本上呈矩形。
13. 权利要求 1 的检测条, 其中的第一种成分包括葡萄糖氧化酶。
- 5 14. 权利要求 1 的检测条, 其中的第二种成分包括一种过氧化酶和一种氧化后变色的指示染料或染料对。
15. 权利要求 14 的检测条, 其中的过氧化酶为辣根过氧化酶。
16. 权利要求 14 的检测条, 其中的指示剂染料或染料对为 (3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒) N=磺酰基苯磺酸-钠结合的 8-苯胺基-1-萘磺酸铵 (MBTHSB-
10 ANS) 。
17. 权利要求 1 的检测条, 其中的第三种成分组成包括抗坏血酸。
18. 权利要求 1 的检测条, 其中的试剂进一步包含一种分离成分, 该分离成分选自由下列物质组成的组: 聚乙二醇、聚 (甲基乙烯基醚/马来酸) 酐、聚丙二醇、聚苯乙烯磺酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇、和聚乙烯磺酸。
- 15 19. 权利要求 1 的检测条, 其中的中间层组成包括一种热塑片。
20. 权利要求 1 的检测条, 其中的中间层组成包括聚酯。
21. 权利要求 1 的检测条, 其中的吸水区和非吸水区域分别构成了膜层的未挤压部分和被挤压部分。
22. 权利要求 21 的检测条, 其中的未挤压吸水区基本上呈柱状, 每个柱的
20 基面在膜上, 相对的顶面在底层上。
23. 权利要求 21 的检测条, 其中的未挤压吸水区基本上呈柱状, 每个柱的基面有膜上, 相对的顶面在顶层上。
24. 权利要求 1 的检测条, 进一步包含一个顶层, 该顶层与膜层顶表面接触, 该顶层具有与化验区相对的贯通的孔。
- 25 25. 权利要求 24 的检测条, 其中的膜层粘在顶层上。
26. 权利要求 25 的检测条, 其中的膜层用一种粘合剂粘在顶层上, 该粘合剂被限制在膜层的非吸水性区域使用。
27. 权利要求 1 的检测条, 进一步包含一个吸收层, 该吸收层与膜上最靠近检测条第一端的那一端接触。
- 30 28. 权利要求 1 的检测条, 进一步包含一个吸收层, 该吸收层接触膜层的

每一端。

29. 权利要求 30 的检测条, 其中的接受样本的贯通的孔靠近检测条上远离第一端的那一端。

30. 权利要求 1 的检测条, 进一步含有一个计时剂成分, 该计时剂由一个
5 化验区组成, 该化验区除试剂外还包括一定量的葡萄糖, 该计时剂在检测条上样后的预定时间使该化验区变色

31. 一种测量生物体液样本中被分析物浓度的方法, 包括下列步骤:

(a) 试剂检测条上样, 该检测条包括

i) 一个底层, 该底层有一个接受样本的贯通的孔;
10 ii) 一个膜层, 具有一个面对底层的样本面, 该膜层包含大量吸水性化验区, 每个化验区与含有至少预定量的被分析物的流体接触后都会变色, 越靠近检测条第一端, 引起化验区变色的被分析物的量就越多。

iii) 计量装置, 使样本从贯通的孔沿预定的非吸水性路径分布到达每个化验区,

15 (b) 通过观察离检测条第一端最远的变色化验区来测定被分析物的浓度。

说明书

可用肉眼读取结果的试剂检测条

- 5 本申请是 1996 年 11 月 1 日提交的 08/743432 号未决美国申请的部分继续申请, 该申请是 1995 年 8 月 3 日提交、现已放弃的 528511 号申请的继续申请, 该申请又是 1995 年 3 月 27 日提交的 411238 号申请和 1995 年 5 月 15 日提交的 442035 号申请的部分继续申请。

 本发明涉及一种测量生物体液中分析物浓度的干燥检测条; 更具体地
10 说, 是一种无需仪器可直接测量浓度的检测条。

 有多种目测装置已被研制出来并用于生物体液中某些被分析物的浓度测量。这些装置例如已能测量血液、尿或唾液中的葡萄糖、胆固醇、蛋白质、酮类、苯丙氨酸或酶的浓度。

- 用结合了基于酶的组合物干相试剂条可检测生物体液样本的葡萄糖浓度, 已广泛用在临床实验室、医生诊室、医院及家庭中。实际上, 试剂条已经
15 成为美国数百糖尿病患者中很多人的每日必需品。由于糖尿病能导致血液化学中危险的异常反应, 继而引起视觉丧失、肾衰及其它的医学后果。为使这些后果的风险降至最小, 多数糖尿病患者必须定期进行自我检测, 然后据此调节他们的葡萄糖浓度, 例如可通过控制饮食和/或注射胰岛素的方法来调节。一些病人
20 每天必须进行多达四次或更多的血糖浓度检测。

 糖尿病患者必须控制饮食以调节糖的摄入量和/或安排好胰岛素的注射, 为此他们还必须经常检测血糖浓度, 因此对他们来说尤为重要是拥有测定葡萄糖的快速、价廉和准确的试剂条。

- 已知的试剂条都含有一种指示剂, 它能根据涂在试剂条上的生物体液中葡萄糖浓度的不同而显示不同的色调。尽管其中一些试剂条中用到了还原化学反应, 试剂条中更普遍的还是涉及可氧化的染料或染料对。一些试剂条包含一种
25 酶, 如葡萄糖氧化酶, 它能将葡萄糖氧化为葡萄糖酶和过氧化氢。它们还含有一种可氧化的染料和一种具有过氧化活性的物质, 后者在过氧化氢的存在下选择性催化可氧化染料的氧化反应。(例如参见 Kiser 等人的、于 1994 年 4 月 26 日
30 公布的美国专利 5306623 号)

Hochstraser 在 1976 年 6 月 22 日公布的美国专利 3964871 号中公开了一种直接测量生物体液成分、如葡萄糖浓度的抛弃型指示条。该指示条记录成分的浓度，它既包括一种指示剂，当与待测成分反应时被氧化而变色，还包括一种“拮抗剂”，在直到被完全消耗掉以前，能在一定程度上防止氧化了的指示剂的累积。

Palmer 等人在 1989 年 5 月 24 日公开的欧洲专利申请公开 0317070 号中公开一种葡萄糖“数字”定量分析系统（亦见于 1991 年 7 月 30 日公布的美国专利 5036000 号）。该系统测量生物体液中有机化合物浓度的方法是首先用一种被作用底物-特异性的氧化酶氧化化合物，产生过氧化氢。该系统包括一个发色团，它是一种过氧化氢的还原剂，和一种空气中稳定的过氧化氢还原剂，具有更大的还原电位。在第一种空气中稳定的过程氧化氢还原剂被消耗掉以前，其所具有的更大的还原电位延迟了由发色团引起的可检测到的变色反应。因此如果待测过氧化氢浓度低于相应于空气中稳定的过氧化物氢化酶浓度的预定水平，就没有变色反应发生。其结果是，系统定量测量了浓度，而不依赖于变色强度。

Englemann 在 1988 年 4 月 19 日公布的美国专利 4738823 号中公开了一种具有一层承载膜的用于被分析物测定的检测条，该承载膜上固定有一种吸收物质，它能除去涂在检测条上的过量样本。检测条也可包括一个覆盖层，它具有用以引入样本的开口。

Burkhardt 等人在 1989 年 3 月 7 日公布的美国专利 4810470 号中公开了一种测量液体样本中被分析物浓度的装置。该装置包括一个或多个吸水性基质，该基质被一种液体防渗涂层或膜所覆盖。样本沉积在吸水基质的某处，以矩阵色谱法测量。样本通过毛细作用到达化验区，该处含有一种被分析物的检测试剂。

Daffern 等人在 1991 年 2 月 19 日公布的美国专利 4994238 号中公开了一种化学分析检测装置，该装置由一个吸收层、一个防水屏障层和一个具有可检测体积的试剂层组成。样本通过盖在上面的吸收层与屏障层上互相对齐的小孔涂在试剂层上。

无论检测是在家中、医生诊室中、临床中还是在医院中进行，葡萄糖检测的准确性与可再现性都是至关重要的。在指示颜色的试剂条中，需要颜色变化

明显，且对生物体液中葡萄糖以外的成分的浓度变化不敏感。在机读检测条中，变色表现为在给定波长下的吸收度变化，尽管它对准确性来说也是很重要的，但是由于糖尿病患者可能已有视力损伤，对他们来说，拥有一个根据葡萄糖浓度而显著变色的目测试剂条尤为重要。

- 5 由于涉及一系列化学反应，变色不是瞬时发生的。因此用户为了反应的发生必须要等上一段时间——一般为一分钟或不到。若用仪器测量检测条，计时电路会给出信号，表明反应已完成。但是若用肉眼测量检测条，没有仪器的帮助，用户也许低估了所需时间，过早数而得出不正确的结果。或者，用户也许得有必要的在读数前等足够时间，以确保反应完成，结果造成不必要的耽搁，令用户
- 10 不快。因此需要一种“化学”计时剂，也就是说一种检测条中的成分，它的变色与样本中葡萄糖（或其它所考虑的分析物）浓度无关，而仅仅是在经过足够时间后，完成了与样本的生色反应才发生变色的。

按照本发明，测量涂在其上的生物体液样本中被分析物浓度的加长多层试剂检测条的组成包括

- 15 a) 一个底层，该底层有一个接受样本的贯通的孔；
- b) 一个膜层，面对底层一面为样本面，相对的另一面为检测面，该膜层沿其长度方向分布有大量吸水性化验区域，彼此之间是被非吸水区分隔开的，膜中含有一种能与被分析物反应发生变色的试剂，该试剂组成包括
- i) 与被分析物反应生成过氧化氢的第一种成分；
- 20 ii) 与过氧化氢反应发生变色的第二种成分；和
- iii) 抑制第二种成分变色的第三种成分；
- c) 一个位于底层与膜层之间的中间层；
- d) 使样本沿检测条分布开来的计量装置，该装置组成包括形成于中间层中的流体转运通道，引导样本经膜表面到达吸水性化验区；抑制剂浓度在离检测条
- 25 第一端一定距离处以预定方式升高，因此若要发生变色，样本中所含有的被分析物浓度也必须相应升高；其中当样本涂在检测条上后，一个或几个化验区变色，而离第一端最远的变色区指示出样本中被分析物的浓度。

测量生物体液样本中被分析物浓度的操作方法步骤包括：

- a) 将样本涂在试剂检测条上，该检测条组成包括：
- 30 i) 一个底层，该底层有一个接受样本的贯通的孔；

ii) 一个膜层, 具有一个面对底层的样本面, 该膜层包含大量吸水性化验区, 每个化验区与含有至少预定量的被分析物的液体接触后都会变色, 越靠近检测条第一端, 引起化验区变色的被分析物的量越多;

iii) 计量装置, 使样本从贯通孔沿预定的非吸水路径分布到达每个化验区;

b) 通过观察离检测条第一端最远的变色化验区来测定被分析物浓度。

该检测条是这样一种类型, 它可见地指示出涂在检测条“样本面”上的生物体液中所含的被分析物浓度。可见指示显示在检测条反面(或“检测面”)。

检测条的化学组成当然依据所要测量的被分析物/生物体液而定。检测条可被设计为用于检测诸如血液、尿、唾液以及水之类的生物体液中的被分析物, 如葡萄糖或其它糖类、乙醇、胆固醇、旦白质、酮类、尿酸、苯丙氨酸或酶。出于简单方便的考虑, 本说明书中详细公开了检测血液中葡萄糖的试剂检测条。本领域的普通技术人员从本说明书所公开的信息中很容易想到将其用于检测其它被分析物/生物体液的组合。

本发明检测条提供了相对简便快速的测定待测血样中葡萄糖浓度的方法。检测条组成包括一个底层, 底层有一个孔, 样本通过该孔被引入多孔基质的样本面上, 样本面的反面是检测面。基质一般是一种膜, 两词在本说明书及所附权利要求中是可以互换使用的。检测试剂加在基质上, 或多或少地浸渍在基质的孔中。为简便计, 在本说明书及所附权利要求书中我们有时将基质上的试剂称为“涂层”, 是指试剂涂层渗透基质。

中间层位于底层与基质之间。在一种实施方式中, 中间层中排列着不连续的膜的非吸水区, 引导样本进入沿检测条公布的一系列吸水性化验区。(本说明书及所附权利要求书中所用“吸水”意为吸收性的。)中间层中在化验区周围及上方由一系列凹口围成的空间限制样本流向这些区域。在另一种实施方式中, 中间层中有一个加长实际上是矩形的孔, 使样本到达吸水区的连续部分, 吸水区是被一个非吸水区分隔开的。

一定体积的样本——一般为包括红细胞和葡萄糖的全血——直接点在膜样本面的一系列化验区的每个区域中。基质的多孔性使流体例如可通过毛细作用从样本面流向检测面。于是检测试剂与血液中葡萄糖反应, 在检测面上或附近发生变色。由于红细胞颜色深, 使对变色的检测较为困难, 因此基质优选是各向

异性的，即从样本面到检测面，孔径从大逐渐变小，以使红细胞在远离检测面处即被捕获。有多种物质可用作本发明检测条和计时剂的各种成分。其中一些物质公开在 Kiser 等人的分别于 1994 年 4 月 26 日和 1995 年 5 月 23 日公布的美国专利 5306623 和 5418142 号中，结合在此作为参考。

- 5 检测试剂组成包括一种将葡萄糖转化为过氧化氢的成分，如葡糖氧化酶；一个或几个检测由存在于样本中的葡萄糖所产生的过氧化氢的成分；和一种抑制剂。检测过氧化氢的成分可以是过氧化酶、优选为辣根氧化酶，以及在反应过程中变色的“指示剂”。指示剂可以是一种可氧化的染料或染料对。在过氧化氢的存在下，过氧化酶催化指示剂的氧化反应。试剂的最后一种成分是抑制
- 10 剂，它延迟了指示剂氧化变色反应的发生。

- 检测条沿其径向分段，分段方式是使相邻的膜节段具有不同的抑制剂浓度。每个节段有一个吸水化验区，当存在足够的葡萄糖首先消耗完所有的抑制剂，然后氧化指示剂，于是引起特征性的颜色变化时，化验区才变色。因此某一特定区域的变色便显示出原始血样中葡萄糖浓度。沿检测条特定方向，每
- 15 个节段的抑制剂浓度逐渐升高，这与逐步增加的葡萄糖浓度相对应。所有节段中指示剂的浓度也是如此。原则上其它抑制剂/指示剂的平衡也是可能的。

- 对于一种具体的检测样本，如果节段的抑制剂浓度范围适当，当相邻的化验区与被分析物反应后，其中一个变色，而与之相邻的另一个就不变色。这种结果表明，样本中葡萄糖浓度至少等于该变色区变色所需的浓度，而小于相
- 20 邻化验区变色所需的浓度。

- 为了进行血糖监测，可选的计时剂节段涂层组成包括指示条—涂有检测试剂的多孔基质—的成分，另外还有葡萄糖。干燥状态下，试剂化学不被葡萄糖活化，而当样本涂在检测上后，计时剂涂层被水合，涂层中的葡萄糖在预定时间后使指示剂发生变色。优选地，计时剂中葡萄糖含量大大超过克服抑制剂作用所需用量。这时，所需时间的长或短取决于抑制剂含量的多或少。检测条与
- 25 计时剂中的颜色变化可直接通过肉眼观测，或者用光学仪器检测反射光的变化。

图 1 为本发明的直接读数的试剂检测条基质透视图。

图 2 为本发明的直接读数的试剂检测条样本面底平面剖视图。

图 3 为图 2 检测部分切开的内部透视图放大片段。

图 4 为图 2 检测条沿 4-4 线的截面图。

图 5 为图 2 检测条的底平面图。

5 图 6 为顶平面图，所示为图 5 检测条的检测面。

图 7 为上样后的图 6 检测条。

图 8 为图 2 检测条另一种实施方式的剖视透视图。

图 9 为图 8 检测条的底平面图。

图 10 为图 8 检测条的顶平面图。

10 图 11 为图 10 检测条沿 11-11 线的截面图。

本发明是用于测量生物体液中待分析物浓度的直接读数的试剂检测条。该检测条的关键组成是结合了检测试剂的多孔基质，该检测试剂对涂在检测条上的生物体液样本中待分析物产生对应的颜色变化。

基质可以是统一的组合物或者是涂层了的底物，可以是各向同性的或者是
15 各向异性的。它有一个供上样用的样本面和一个观察变色的检测面。基质优选为各向异性的膜；更优选为具有较宽孔径范围的各向异性膜。例如，在膜中延伸开来的孔径梯度从约 0.1 微米至约 150 微米。在大孔一面，优选的孔径范围为约 30 微米至约 40 微米。在膜孔径较小的一面，空体积相对较小，且膜原料一般是相当稠密的，一层内一般可达到膜厚度的 20%。该层内优选的孔径范围
20 为约 0.1 微米至 0.8 微米，指定孔径优选约为 0.3 微米。当生物体液涂在样本面上，样本在透过膜时所经过的孔不断变小。诸如红细胞之类的固体基本上在到达膜中某处后就不能进一步透过了。样本余量还含有溶解了的葡萄糖，可以透过到达检测面。膜的各向异性和/或分离成分的使用（下文有所论述）使样本穿过膜的流速相对较快，即便同时还在进行着固体成分的过滤作用。

25 当样本穿过基质，样本与试剂的反应使光吸收染料在检测面附近空体积中生成或分解，因而在实际上对基质的反射性产生影响。

聚砜和聚酰胺（尼龙）是适宜的基质原料实例。也可使用其它性质相当的聚合物。聚合物经改性处理可引入其它可提供荷电结构的官能团，使基质表面可以是中性、阳性或阴性。

30 形成基质的多孔原料的制备方法优选为不用承载核（supporting core）来

制备聚合物。这样的基质例如是来自 Memtec, Inc, Timonium, MD. 的各向异性聚砷膜。通常使用厚度小于 200 微米的基质, 优选使用约 115 至 155 微米的基质。尤其当基质是尼龙或各向异性聚砷时, 厚度更优选为 130 至 140 微米。

用检测试剂处理膜的方法可以是将膜蘸在试剂成分的混合物中, 使膜饱和。优选地, 至少一些成分是按顺序涂在膜上的。过量试剂可用机械方法除去, 用气刀 (air knife)、手术刀或玻璃棒。然后使膜干燥。试剂易于富集在膜的小孔 (检测) 面附近。

检测试剂组成包括 (i) 使葡萄糖转化为过氧化氢的成分, (ii) 检测过氧化氢的成分, 和 (iii) 抑制过氧化氢检测成分的成分。试剂可选进一步包括一种分离成分, 该分离成分使诸如红细胞的固体被捕获在基质中, 可有效地除去生物体液中的固体成分。还可以包括附加成分, 在下文及实施例中有所论述。

将葡萄糖转化为过氧化氢的优选成分包括葡糖氧化酶, 这是一种通常从黑曲霉或青霉中得到的酶。葡糖氧化酶与葡萄糖与氧反应生成葡糖酸内酯和过氧化氢。葡糖氧化酶的最佳浓度与指示剂系统的组成有关。例如, 若指示剂系统为 MBTHSB-ANS (下文有论述), 葡糖氧化酶适宜的浓度范围为 500-10000U/mL, 更优选为 700-2000U/mL, 最优选为 1000U/mL。一般来说, 葡糖氧化酶浓度越高, 反应进行得越快, 浓度越低反应越慢。

反应所得过氧化氢与检测过氧化氢的成分反应, 该成分包含一种过氧化酶, 该酶选择性催化过氧化氢与指示剂之间的反应。过氧化酶使过氧化氢起到氧化剂的作用, 能够除去各种被作用物的氢原子。适用的过氧化酶可含有正铁血红素, 这是一种来自植物的氯化血红素。来自动物的过氧化酶也是适用的, 如来自动物的甲状腺。辣根过氧化酶 (HRPO) 是过氧化氢检测成分中尤其优选的一个组分。

优选在过氧化酶的催化作用下, 过氧化氢直接或间接反应生成或分解一种在预定波长范围内吸收光线的指示剂染料。指示剂染料产生强烈吸收的波长优选与检测试剂产生强烈吸收的波长不同。指示剂的氧化形式可以是有色、淡色或无色的最终产物, 该最终产物使基质检测面发生变色。也就是说, 检测试剂指示出样本中被分析物存在的方法是使有色区域褪色, 或者使无色区域显色。

用于本发明的指示剂包括 (a) 盐酸 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒 (MBTH)

- 结合的 3-二甲氨基苯甲酸 (DMAB); (b) MBTH 结合的 3,5-二氯-2-羟基苯磺酸 (DCHBS); (c) 4-氨基安替比林 (4-AAP) 与 5-氧代-1-对磺苯基-2-吡唑啉-3-羧酸 (OPSP); (d) 4-AAP 与 N-间甲苯基-二乙醇胺 (NDA); (e) 2,2'-连氮基-二(3-乙基苯并噻唑啉)磺酸 (ABTS); (f) 4-AAP 与 4-甲氧基萘酚; (g) 焦赭酚红 (PRG); (h) 溴焦赭酚红 (BPR); (i) 酸性绿 25 (AG); 或 (j) (3-甲基-2-苯并噻唑酮脲) N-磺酰苯磺酸-钠 (MBTHSB), 结合了 8-苯胺基-1-萘磺酸铵 (ANS)。优选 MBTHSB-ANS。有关 MBTHSB-ANS 的其它信息见于 1996 年 10 月 8 日公布
5 的美国专利 5563031 号, 结合在此作为参考。
- 10 某种抑制成分可延迟过氧化氢与指示剂之间的反应, 例如可通过还原过氧化氢或还原氧化了的指示剂。抑制剂基本上有若干不同的作用方式。首先, 抑制剂与指示剂竞争, 使指示剂发生变色的速率减慢。其次, 抑制剂也可能是非竞争性的, 这样指示剂在实际发生变色之前所有的抑制剂基本上已被消耗掉。其它的抑制剂作用方式也是可能的。本发明的抑制剂优选为非竞争性的。
- 15 适用的抑制剂有 2,3,4-三羟基苯甲酸; 赭酸丙酯; 3,4-二羟基肉桂酸; 3,4-二羟基苯甲醛; 赭酸; 5,6-二氨基尿嘧啶; 抗坏血酸; 异抗坏血酸。优选抗坏血酸; 不过抗坏血酸在溶液中氧化, 因此必须使其稳定, 才能进行试剂涂层。稳定剂优选伯醇, 如乙醇、甲醇或丙醇。优选乙醇, 特别是其浓缩溶液, 即 50% 溶液或浓度更高的乙醇溶液。
- 20 尽管作为优选基质的各向异性膜可滤除红细胞并使它们远离检测面, 检测试剂中还以可选地含有一种分离成分。分离成分通过将红细胞螯合在基质上, 应该能够使诸如全血之类的含有红细胞的液体变成相对无色的流体。用于本发明的分离成分包括但不限于聚乙二醇、聚(甲基乙烯基醚/马来酸)酐、聚丙二醇、聚苯乙烯磺酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚乙烯磺酸, 其 pH 在 4.0 至 8.0 之
25 间。基质中该分离成分的含量取决于其电荷及分子量、镶嵌在基质中的其它成分、基质的 pH 及孔径和基质干燥后的残留水分。本领域技术人员易于确定这些参数。例如若分离成分用聚丙二醇(如来自 BASF, Wyandoffe, MI 的 PPG-410), 其含量优选为 2-30%重量体积比 (W/V), 更优选为 8-10%W/V。也可使用浓度为 2-30%W/V 的其它分离成分。在制备过程中聚合的分离成分可
30 以浸入或镶嵌在基质中或制成膜。

某些水溶性盐也能分离血液成分。适用的分离血液成分的盐有柠檬酸盐、甲酸盐和硫酸盐，以及某些酸，如氨基酸、柠檬酸、肌醇六磷酸和苹果酸（例如参见 M.C.Fetter 的于 1971 年 1 月 5 日公布的美国专利 3552928 号）。使用分离成分的一个优点在于由于它从生物体液中基本上可以除去固体、如红细
5 胞，在检测部位对检测试剂的变色反应就较少背景色干扰。

在基质中还可嵌入其它成分来增强检测条的显色及可读性，保持基质的完整性及牢固性。例如，检测试剂中可包含盐类和/或缓冲系，有助于基质中染料的分
10 离。缓冲系例如可含有柠檬酸盐，溶液浓度为 0.01M 至 1.0M，优选为 0.1M。也可用其它缓冲系。

也可用赋予基质亲水性的化合物或起到稳定剂作用的化合物，如水解旦
15 白。这类化合物例如包括但不限于牛血清白旦白、多肽和小分子量旦白质，如 Crotein SPA(CROD,Inc,New York, N.Y.)。该化合物所用浓度例如 1mg/mL 至 100mg/mL。若用 Crotein，浓度优选为 300mg/mL。

基质涂层中还可包括其它稳定剂及防腐剂。例如可用乙二胺四乙酸
15 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)及相关化合物，其浓度例如 0.01mg/mL 至 10mg/mL。防腐剂的作用是有助于抑制剂的稳定。

一些指示剂（如 BPR）有在基质中移动的趋势，这是人们所不希望看到的。如果使用这样一种指示剂，为防止移动要加入一种离子对试剂。例如，聚
20 乙二醇衍生物，如 Polyquart(H)商品（Henkel,Inc,Ambler,PA）尤其适用，因为它们指示剂与其它基质组分之间能促成离子对的形成。

在用生色反应指示出被分析物的存在时（如 MBTHSB-ANS），可加入表面活性剂，使颜色明显，增强与无色环境的对比。

本发明在实施时也可使用有机溶剂，并可被包含在基质检测试剂的组成
25 中，当然只有它们与基质及检测试剂组成相容才行。可能适用的有机溶剂包括氯仿、丙酮、醇类、二氯甲烷、二乙醚及石油醚、乙腈及它们的混合物。在实施本发明时特别优选 70%的乙醇水溶液。

涂在基质上或浸入基质中的检测试剂在检测条表面上不是均匀的。相反，试剂优选按系列平行于检测条宽度的带、或“节段”用在基质上。毗邻节段的
30 抑制剂浓度逐步升高。第节段有一吸水性化验区。只要血液中葡萄糖浓度大到足以克服化验区中抑制剂的作用水平，检测试剂正是在化验区中与葡萄糖反应

变色。因此，使连续的化验区变色所需样本中葡萄糖浓度逐步增加。

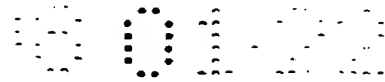
可选地，将化验区之一作为计时剂，能指示出每个化验区上试剂与葡萄糖反应所经过的足够的时间。基质的计时节段涂以或浸以组成为检测试剂外的葡萄糖的组合物。由于检测试剂目的在于与葡萄糖作用发生变色，将二者结合起来而不引起颜色变化需要小心操作。为此必须加入大大超过计时功能所需量的抑制剂。加入含葡萄糖溶液后，控制计时节段干燥的速率。实际操作中，首先将含有缓冲系、稳定剂和酶的溶液涂在膜上，涂层干燥形成第一层。然后用含有指示剂、抑制剂和葡萄糖的溶液涂第二层。预先进行参数确定，如网织速度（web speed）、烘箱温度、气流、及涂层溶液沉积量，并对抑制剂和/或葡萄糖浓度进行适当调整。还有一种方法不是直接涂第二层，也不是优选的方法，是在单独的网上形成第二涂层，再将其盖在第一层上。

样本涂在检测条上后，计时节段组合物的水合作用使生色反应得以进行。然后计时节段发生变色所需时间由温度和检测试剂的性质来决定，尤其是由抑制剂浓度、葡萄糖含量、以及水合作用及氧扩散速率来决定。

计时剂变色时间既可以根据样本中葡萄糖浓度而定，也可以与该浓度无关。通过在计时剂中加入过量葡萄糖，变色时间基本上就与样本的葡萄糖浓度无关了。如果在计时剂中加入少量葡萄糖，变色时间就取决于样本中的葡萄糖，也就是说，样本中葡萄糖浓度越大，计时剂变色越快。计时剂中葡萄糖浓度优选大于 1500mg/mL，使计时剂基本上与样本中葡萄糖浓度无关，后者的范围为 40-400mg/dL。计时节段组合物包含过量的使葡萄糖转化为过氧化氢的成分（如葡萄糖氧化酶）和过量的葡萄糖。计时剂组合物还应该含有与结果节段相等或较之更多的抑制剂，结果节段所含有的抑制剂是最多的（相应在于葡萄糖读数最高）。

计时剂还具有重要的质量控制作用，当检测条因接触水分而被损坏时，计时剂使其变得透明。检测条必须在使用前保持干燥，这是因为使葡萄糖转化为过氧化氢的成分（通常是酶）接触水分后分解。因此若检测条事先接触水分就被损坏了。但是如果用户对此并没觉察，可能会用该检测条得出错误的结果。不过当检测条中含有计时剂后，接触水分使计时剂变色，提醒用户检测条已损坏，不能再用。

有关计时剂的其它信息见于 1996 年 9 月 3 日提交的未决美国专利申请系



列号 08/706753, 结合在此作为参考。

除了含试剂的基质以外, 本发明的检测条还含有承载基质的底层。底层优选是一种热塑片, 更优选是一种聚酯, 一般厚约 0.05/0.2mm, 该底层有一个孔, 样本通过该孔上样到基质的样本面。血样从上样孔沿基质径向分布开来。底层一般是不透明的, 如果是这样, 可在离上样孔适当距离处设置一个或几个透明小窗, 通过观察小窗中的样本外观可以确认已有足量样本上样到检测条上。

血从上样孔向化验区分布时要经过位于底层与膜之间的中间层, 中间层可选地粘附在两层之间。中间层优选是一种热塑片, 更优选是一种聚酯, 一般厚约 0.05-0.2mm。在一种实施方式中, 中间层中的切口引导样本在检测条径向上沿膜的非吸水性路径到达每个化验区。中间层中的凹口与化验区一致, 使每个化验区实际上被中间层壁所包围。在另一种实施方式中, 中间层有一个加长的实际上是矩形的孔, 引导膜表面附近的样本到达化验区。矩形孔宽度一般为 0.5-3mm。

通过破坏膜的孔结构来形成膜上非吸水性路径的优选结构。加热可做到这一点, 加热方式为直接加热式使用激光或超声波, 优选还有加压的方法, 不过更优选的方法是挤压法。通过挤压使膜除了化验区以外都变成非吸水性的(但仍是亲水性的)。在本发明的一个实施方式中, 在两片平板之间挤压膜, 同时用模片防止化验区被挤压。压力优选为至少 6 吨/英寸² (80000 千帕)。可选地, 平板可被加热至 110℃ 以上。优选的压力与时间当然要取决于挤压机理与停留时间, 以及膜参数。通过常规试验可确定最优值。如下所述的实施方式中, 膜经这种方法挤压, 使化验区延伸至底层, 膜中还有带凹口的中间层。

为测量准确, 提供给每个化验区的血液体积优选是可再现的。如果凹口完全环绕着化验区, 并假设在中间层与底层及挤压膜之间可实现液密封, 那么每个化验区将形成一个封闭的(圆筒形)体积, 其周壁为中间层, 两端为膜层与底层。不过沿检测条还有一条分布通道, 将样本送达各化验区。优选在底层有若干排气孔, 沿化验区排列, 有助于样本均匀地填充通道和化验区。测量的高精确度要求分布通道向每个化验区供应固定体积的样本, 但至少在血液上样 90 秒后开始的测量时段—约 1 或 2 分钟内不再供应样本。由于最初的样本体积是可变的, 优选在膜的两端存在在一吸收层, 可除去分布通道末端的过量样本。吸收层在通道末端也能讲样本沿检测条径向的毛细作用。本领域已知非织结

物可构成优选的吸收层。

在本发明的另一种实施方式中，用辊来压膜及盖片。盖片上设置有孔，将化验区容纳其中，未被挤压的化验区延伸到孔中。该实施方式中无需模片，挤压作用优选由辊完成，工作压力至少为 1000lb (4450N)。值得注意的是本实施方式中化验区的延伸方向与上述实施方式相反。由于样本呈开放状态被吸向上层，底层不再设排气孔。本实施方式中中间层有一个基本上是矩形的孔，引导样本到达化验区。由于该实施方式中上样孔位于检测条的“高浓度葡萄糖”化验区末端附近，在检测条另一端附近只需一个吸收层即可。

由待测样本中葡萄糖所引起的颜色变化显现在膜检测面上。在化验区延伸向底层的实施方式中，方便的做法是将具有沿化验区排列的孔的上层盖在膜的检测面上。孔的作用是便于观察变色和使氧到达反应部位。若化验区向相反方向延伸，如上所述，在挤压过程中上层中的孔界定了化验区。两种情况中，上层优选是一种热塑片，更优选是一种聚酯，一般厚约 0.05-0.2mm。上层可例如用一种粘合剂粘在膜上。如果粘合剂干扰葡萄糖测量反应，粘合剂优选被限于在膜的非吸收区域使用。不过如果粘合剂对该反应没有干扰，其位置不是很重要。

由于含有优选试剂的化验区与光或氧接触后缓慢变色，还由于可选的计时剂对水分敏感，优选将检测条包在不透氧且防水的不透明外套中，如密封的箔纸。如果检测是单包装的，检测条在使用过程中可留在开封的包装纸中。

参照附图将对本发明作进一步说明。图 1 为本发明测量生物体液中分析物含量的基质 10。尽管图中呈拱状弯曲，其实基质 10 是柔软的，一般在使用时是平面状的。基质包括样本面 12，供生物体液上样用，和检测面 14，在其上或附近发生的变色指示被分析物的存在。变色的产生来自被分析物与浸入孔 16 中的试剂的相互作用。在测量血中葡萄糖浓度时，样本面 12 附近的孔径相对较大，在接近检测面 14 时孔径减小。孔径梯度用来在样本面 12 附近捕获红细胞，使后者的颜色不会干扰对指示被分析物存在的颜色变化的观察。

三个平行节段 a、b、c 如图所示。每个连续的节段比前一个含有逐步增加的抑制剂。在优选的实施方式中，如图所示，平行节段中膜上加入试剂后，将膜上除了发生被分析物试剂反应以外的部分进行挤压。平面图 2 和放大的透视图 3 片段说明了该种方式的实施方式，即吸水性化验区一位于每个平行节段

中的单一区域一和被挤压的非吸水区。

图 2 为膜 10 的样本面 12 与吸收层 20、22 的局部剖视的底平面图，膜上盖有中间层 24 与底层 26。优选膜 10 与吸收层 20、22 被一顶层承载着，图中未表示出来。吸收层 20 与 22 优选位于膜的末端（虚线 A 和 B 以外），吸收超过测量所需量的血样。该测量所需量必须足以使样本到达每个化验区，以及计时剂，如果有的话。一般来讲，检测条所含化验区很少，不需要很多样本，但是所检测的葡萄糖值的范围较小，和/或准确性较差。图 2 中标出 9 个吸水区，代表 8 个化验区（编号 1-8）和 1 个计时剂（T），既不需要无法接受的大量样本，也具有足够的测量范围和准确性。中间层 24 有一个凹口 28，与底层 26 上的上样孔 30 对齐。从上样孔 30 上样，样本通过毛细作用沿中间层 24 的中央通道 32 被引向每个化验区和计时区，任何过量的样本被吸收在吸收层 20 与 22 中。通过可选的小窗 34 与 35 进行观察可以确认定量样本被用于测量。优选中间层 24 与膜的样本面 12 之间形成密封，这样样本就不会直接在毗邻的化验区之间流动。

图 3 为放大的透视图片段，表示出从底层 26 方向来看的 6、7、8 三个化验区，和用手指分开的中间层 24。可选的粘附层 24a 将中间层 24 粘在底层 26 和膜 10 上。底层 26 上的排气孔 40 有助于样本在检测条中的流动。顶层 36 上正对着吸水区的孔，如 38，可供吸水区的变色观察之用，使变色反应所需的氧进入。可选的粘附层 36a 将顶层 36 粘在膜 10 的检测面上。

图 4 为图 2 沿 4-4 线截开的截面图，表示出顶层 36，以及图 2 所示的层。底层 26 上的排气孔，如 40，正对化验区和计时区，有助于样本充满每个区域周围的空间。所要充满的空间由膜 10、中间层 24 和底层 26 围成。值得注意的是柱状化验区延伸至底层 26，化验区与底层之间的最小分离度一般仅为约 12 微米。为清楚起见，图示分离放大了。

图 5 为本发明检测条的底平面，中为上样孔 30 和指导用户通过该孔上样的图例。通过透明小窗 34 与 35 观察，可以确认足量样本已被上到检测条中了。

图 6 为检测条顶层 36 的平面图，该检测条已经用葡萄糖浓度对化验区进行过校正。

图 7 所示为图 6 的检测条，是在血样已被上到开口 30（图 2）之后，样本已沿中央通道 32 扩散开来，样本中的葡萄糖已经与化验区中的试剂反应。

由于底部的化验区中抑制剂最少，也就最先变色。然后是第二个、再后是第三个区域变色。上部的环不变色，这是因为样本中的葡萄糖太少了。由于已经经过了足够的时间使计时剂 42 变色，检测条可以进行读数了。图 7 中所示的结果表明样本葡萄糖浓度至少在 120mg/dL 以上，但要小于 150mg/dL。在计时区 5 42 变色后的任何时间都可以进行读数。值得注意的是图 7 中因与葡萄糖反应而发生的变色是从无色变为有色。不过，系统还可能是这样的工作原理，即葡萄糖引发的氧化反应破坏了指示剂染料，相应地颜色也从有色变为无色。

图 8 为本发明检测条另一种实施方式的剖视透视图。底层 126 有一个引入血样的上样孔 130。不象图 2 实施方式那样，上样孔 30 位于检测条（从一端至另一端）的中部，而本图中上样孔 130 优选位于靠近检测条的一端，在这一端上有指示高浓度葡萄糖的化验区以及可选的计时剂。将上样也定位于这一端有两个好处。第一，减少了血液到达“高糖”化验区（响应时间最长）所用的时间，也就减少了葡萄糖测量所需的时间。第二，减少了计时剂的变异性，由于样本实际上是直接上到计时剂上，也就消除了血液到达计时剂所用时间上的变异性。中间层 124 有一加长的长方形孔 132，其长度与检测条相当，开始于一个切口，该切口与上样孔 130 相应，是正对着上样孔 130 的。长方形孔引导血样流经膜 110 的检测条长度，流向吸收层 120。因样本经过膜 110，部分沉积在计时剂 T' 和八个化验区（编号 101-108）中。通过顶层 136 之相对的孔观察计时剂和化验区。通过透明小窗 135 观察血液外观可确认已有足够样本用于测量。 20

图 9 为图 8 检测条的底平面图，其中指导用户通过底层的孔 130，（和中间层的相对孔 128）上样的图例（如图 5 所示）已被省略。

图 10 为顶层 136 的平面图，图示为计时剂对化验区的校正。

图 11 为沿图 10 中 11-11 线截开的截面图，显示顶层 136、膜 110、中间层 124 和底层 126。箭头标示从底层 126 的孔 130 和与之相对的中间层 124 的孔 128 引入样本的方向。值得注意的是柱状计时区 T' 向上延伸到优选进入对应的孔 138，该孔正对着计时区 T'，是顶层 136 上的九个孔之一，顶层上的孔对着相应的计时剂和化验区。 25

为更好理解本发明，下列实施例进一步说明本发明的各种实施方式。实施例 30 不起到任何方式的限制作用。

例1 BPR 指示剂

制备下列溶液:

蒸馏水	83.5g
1% (w/w) EDTA Na ₂	23.8g
乌头酸	6.0g
NaOH (固)	2.2g
Croetin SPA	4.2g
咪唑	0.6g
甘露糖醇	3.0g
5% (w/w) Surfactol Q1	3.0g
调节 pH 至 4.80	
乙醇	40.0g
PPG-410	5.6g
酶溶液	28.0g
酶溶液	
0.2M	27.0g
葡萄糖氧化酶	165,000U
HRPO	340,000U

- 5 将 Memtec BTSH55 膜浸入该溶液, 使其涂在上面, 过量部分用玻璃棒除去。将涂覆过的膜在 180F、中速气流的漂浮干燥中干燥, 使该网状物在 20 秒内基本上已被干燥。卷起网状物, 准备涂覆第二层, 如下所述。

制备下列溶液:

抗坏血酸 (抑制剂) 储备溶液		稀释剂
蒸馏水	190g	370g
1%EDTA Na ₂	55g	107g
BPR	0.36g	0.71g
Poly Quart®H	6g	11.8g
PPG-410	14.2g	27.8g
抗坏血酸	1.37g	-
乙醇	243g	477g

计时剂溶液

稀释剂（上述每个配方）	120g
抗坏血酸	0.885g
葡萄糖溶液*	17.25g

*葡萄糖溶液是变旋 24 小时、冷冻储存的 16.0g/dL 水溶液。

制得下列储备溶液的稀释液：0.0405:1、0.108:1、0.236:1、0.369:1、0.569:1、1.260:1。抑制剂浓度是逐步升高的，这与化验区所报告的葡萄糖浓度逐步升高相称。这些溶液以及计时剂溶液面对面地涂覆在载酶膜的大孔面上，使每平方毫米膜上沉积大约 1.2×10^{-4} mL。将膜湿润约十五秒，然后按照与上述涂酶步骤中同样的条件进行干燥。结果表明，计时剂在约 70 秒内反应，95%的情况是在 64 与 79 秒之间。

例 2 MBTHSB-ANS 指示剂

10 制备下列溶液:

HPLC 水	1500mL
柠檬酸	16.92g
柠檬酸钠	20.88g
甘露糖醇	15g
EDTA=钠	1.26g
Gantrez S95	6.75g
Croton SPA	36g
葡萄糖氧化酶	1.69MU
HRPPO	1.5MU
Carbopol 910*	75mL
柠檬酸二钠**	225mL

*11%的乙醇溶液

**0.1M，pH5.0

Memtec BTS 35 膜在槽中进行涂覆，使大孔表面与涂层溶液接触；同上，过量溶液用玻璃棒除去。同例 1，将膜干燥后卷起。

制得下列溶液:

溶液 A（指示剂）

溶液 B（润湿剂）



70% (v/v) 乙醇	2819mL	Maphos®60A	41g
MBTHSB	2.98g	70%(v/v)乙醇	205mL
(NH ₄)ANS	25.83mL		
溶液 B	205mL		
2%DTPA	51.25mL		

溶液 C (抗坏血酸储液)

水	115mL
抗坏血酸	4.58g
乙醇	267mL

溶液 D (计时剂)

水	53mL
抗坏血酸	8.75mL
乙醇	123mL
用 70%EtOH 加至	175mL
葡萄糖溶液	40.5mL

每份抑制剂溶液都将溶液 A 固定在 263mL。不同的化验区, 70%EtOH: 溶液 C 比例也从 58.9 至 0.200 不等, 使 70%EtOH+C 在向溶液 A 中加入时对所有抑制剂都是 87.5mL。这样仅有效改变每份溶液中抑制剂的浓度。将含有抑制剂浓度逐步升高的溶液和计时剂溶液(溶液 D)面对面地涂覆在膜的大孔面上。调节沉积率, 使每平方毫米膜上达到 8×10^{-5} mL 抑制剂。膜如上法干燥, 只是干燥滞后涂覆约 1.6 分钟。结果表明, 计时剂在约 60 秒内反应, 而不受血细胞比容为 30 至 55% 的血液或 78 至 420mg/dL 的葡萄糖的作用影响。

本领域技术人员认为, 上述说明及实施例仅供说明本发明是如何实施的, 不起任何限制作用。在不背离本发明范围和精神的前提下, 可对文中的具体内容进行变更。

说明书附图

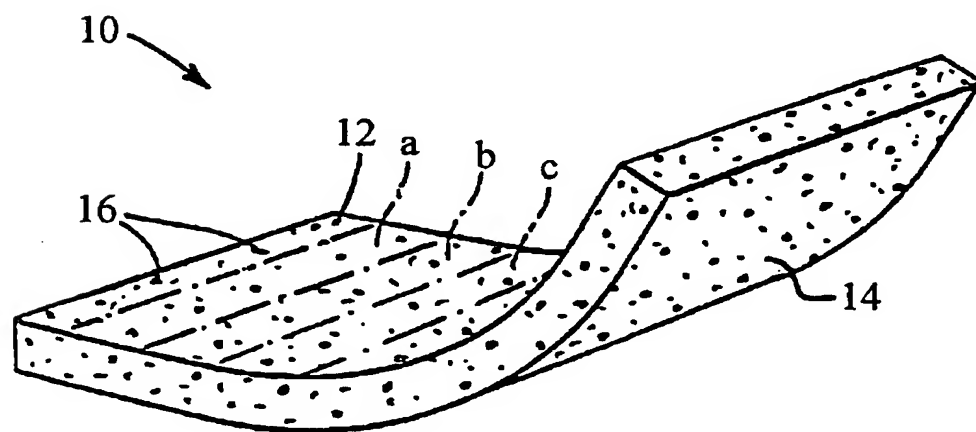


图 1

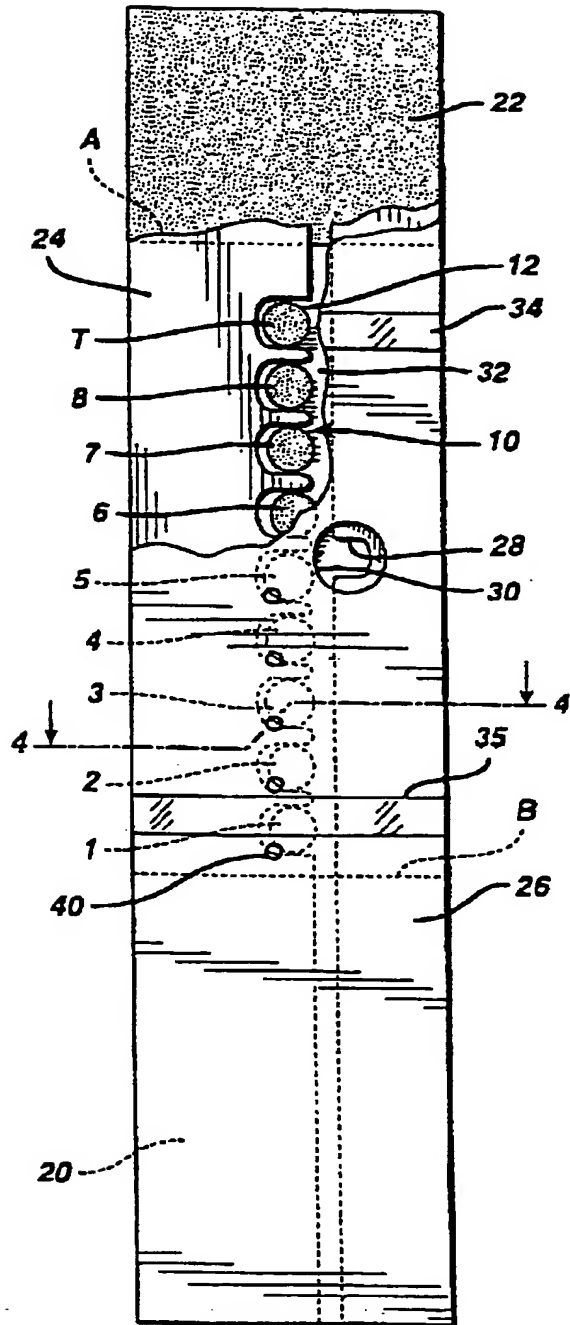


图 2

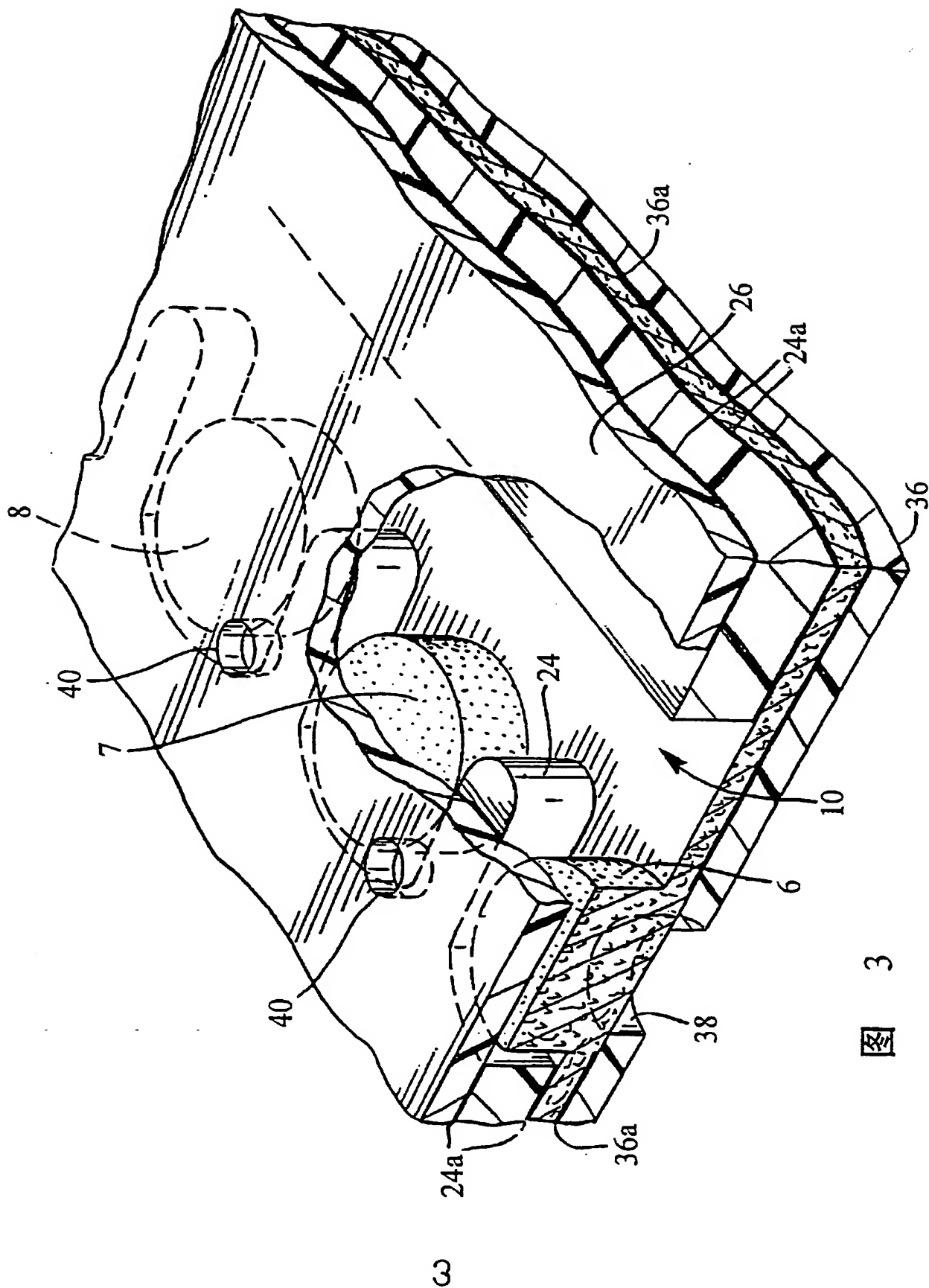


图 3

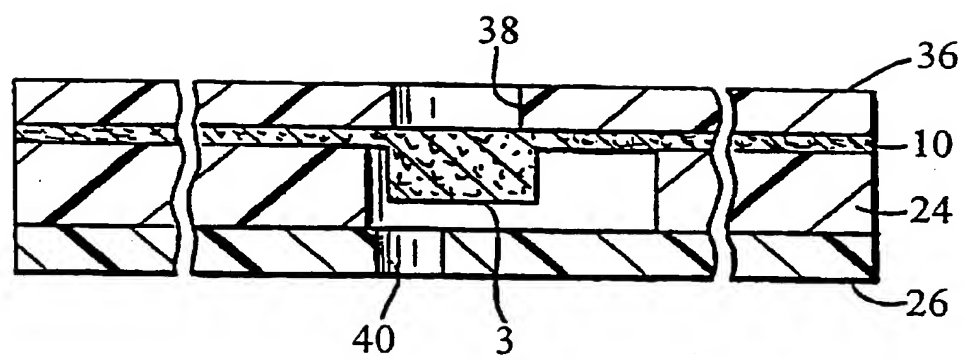


图 4

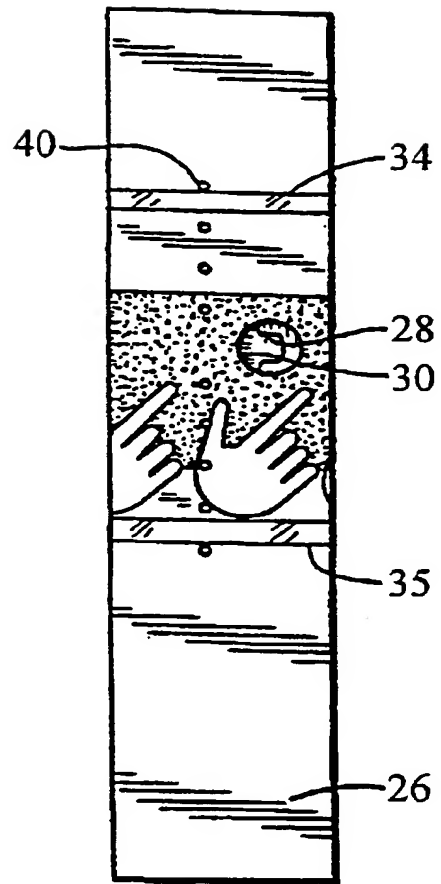


图 5

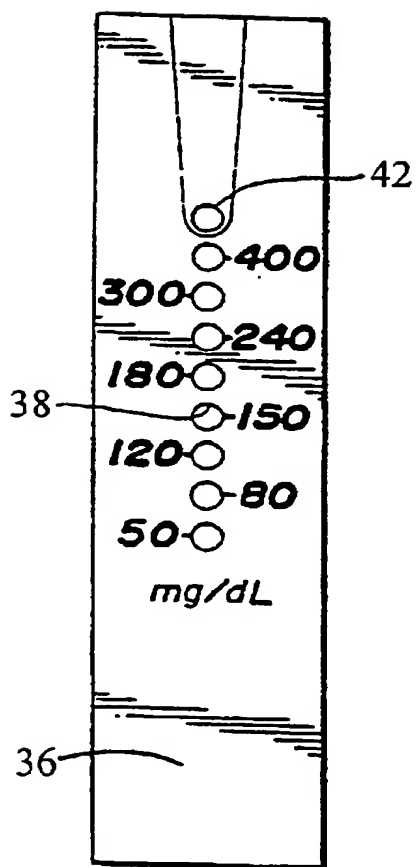


图 6

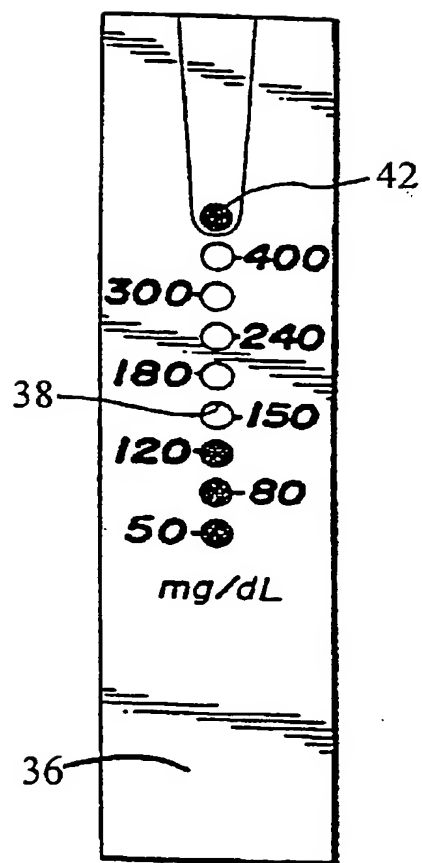


图 7

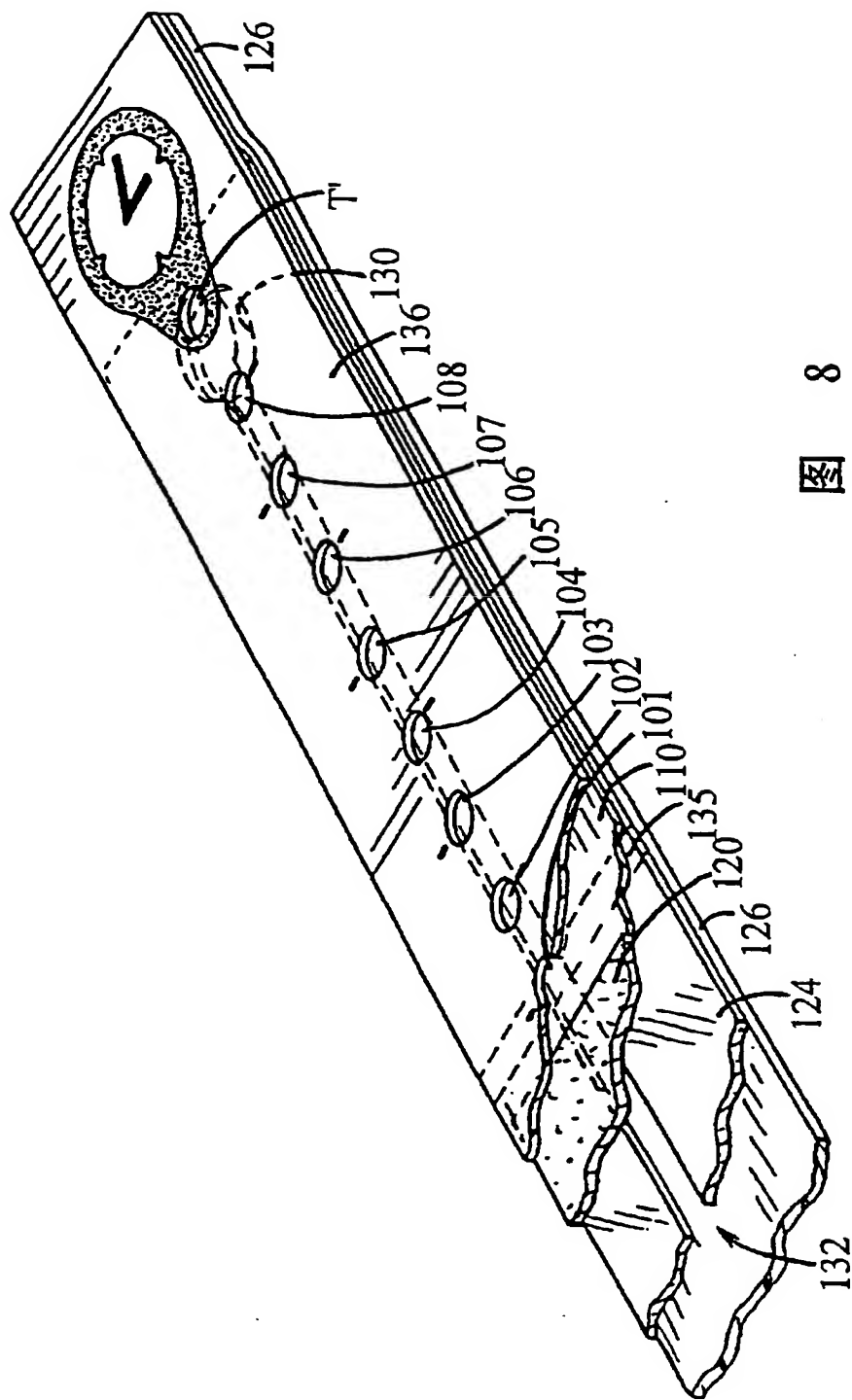


图 8

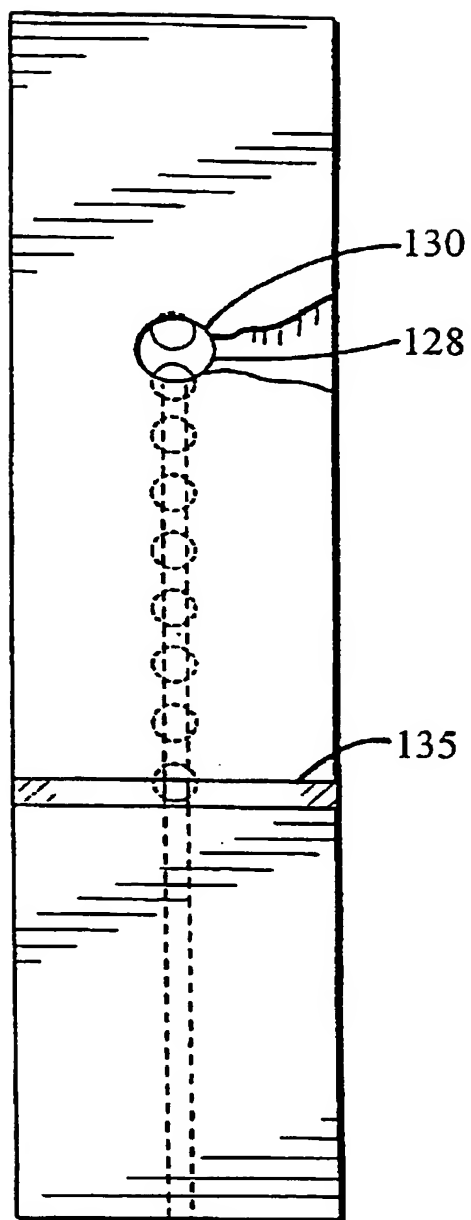


图 9

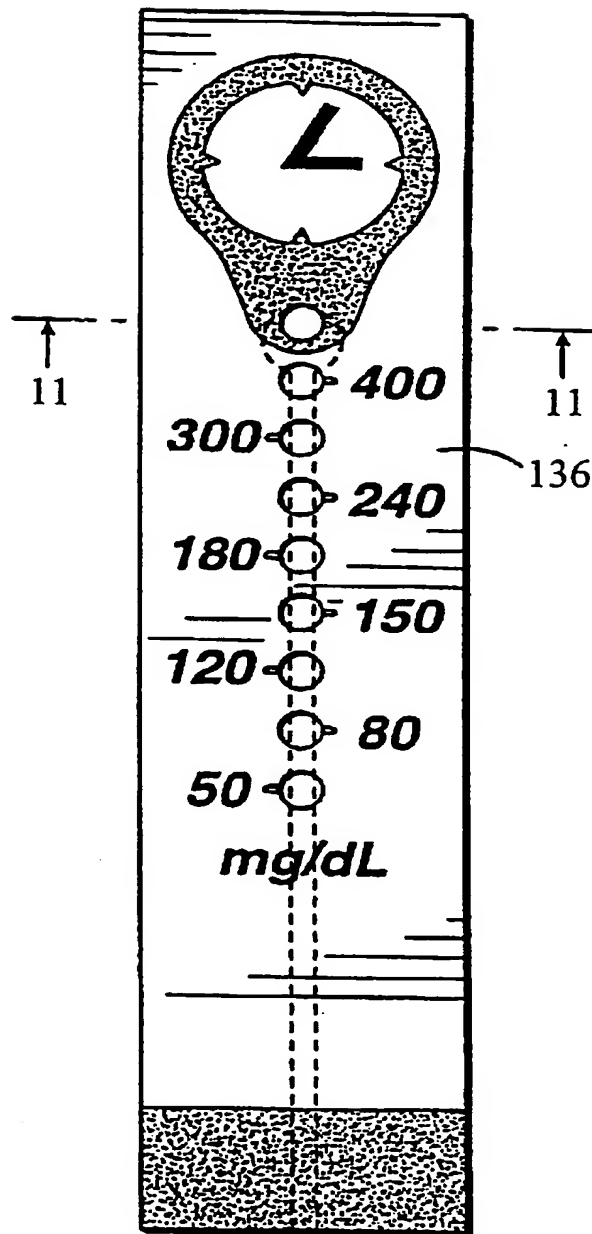


图 10

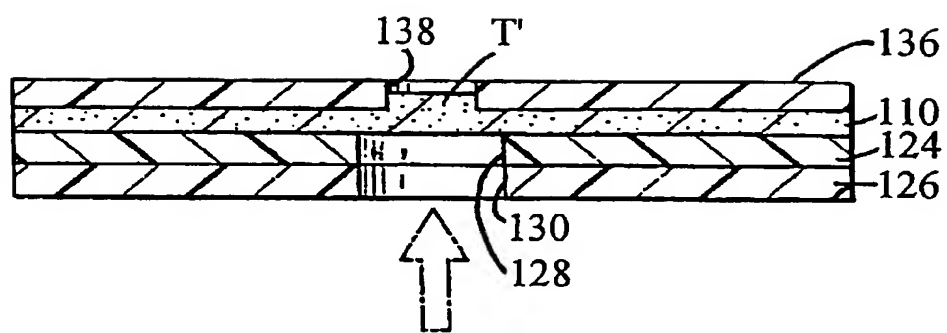


图 11